



Title	The Transmembrane Adaptor Cbp/PAG1 Controls the Malignant Potential of Human Non-Small Cell Lung Cancers That Have c-Src Upregulation
Author(s)	狩野, 孝
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59050
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	かのう 野 孝
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 24886 号
学位授与年月日	平成 23 年 9 月 20 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科外科系臨床医学専攻
学位論文名	The Transmembrane Adaptor Cbp/PAG1 Controls the Malignant Potential of Human Non-Small Cell Lung Cancers That Have c-Src Upregulation (膜アダプターパク Cbp/PAG1 は c-Src の活性が亢進したヒト非小細胞肺癌の悪性度を調節する)
論文審査委員	(主査) 教授 奥村明之進 (副査) 教授 猪原 秀典 教授 野口眞三郎

論文内容の要旨

[目的]

Srcは、膜直下に局在する非受容体型のチロシンキナーゼであり、正常細胞内では主に制御部位がリン酸化された不活性型で存在し、細胞外からの刺激に応答して活性化することによって細胞内シグナル伝達経路の分子スイッチとして機能する。がんの進行に伴ってタンパク質量や活性が増大することによって、Srcががん悪性化形質の獲得に大きく係わることが明らかにされている。当研究室ではこれまでに、Srcの制御因子としてCskチロシンキナーゼおよびCsk結合分子Cbpを同定して、Srcの機能抑制系を明らかにしてきた。また最近、がん化に伴いCbpの発現が著明に低下し、その再発現により造腫瘍活性が抑制されることから、CbpがSrcの係わるがんの抑制因子として機能する可能性が示されている。今回、われわれは非小細胞肺癌を対象にCbpが癌に対して抑制因子として機能するか検討した。

[方法ならびに成績]

1. 非小細胞肺癌および正常細胞におけるSrc、Csk、Cbpの発現をウェスタンブロッティングにて比較した。Cbpは正常細胞と比較して癌細胞において全般的に発現が低下していた。Srcのタンパク量およびその活性状態に関しては、細胞ごとに差があることがわかった。また、手術検体から抽出したCbpのmRNA量を定量的リアルタイムPCRにて比較すると、非癌部にくらべて癌部では有意にその発現量が低下していることを見出した。
2. Srcの活性が高い細胞株と低い細胞株にそれぞれCbpを過剰発現させ、その影響を各種アッセイを用いて評価した。すると、colony assayやin vivo tumor growth assayにてSrc高活性の細胞株ではその増殖能が抑制されることが明らかとなった。またSrcの活性が低い細胞株ではその抑制効果は有意なものではなかった。Srcの下流のシグナル伝達をウェスタンブロッティングにて解析したところ、Srcの代表的な基質であるFAKのリン酸化がCbpの導入により抑制されていた。
3. 次にCbpによる増殖抑制効果がCskを介したものかどうか検討すべく、Cskとの結合能を失ったCbp変異体をSrcの活性が高いA549細胞に導入した。増殖能を比較すると、WTのCbpを導入した細胞では増殖が抑制されるのに対し、Cbp変異体を導入したA549細胞では増殖能に変化はなかった。
4. つぎに、A549細胞におけるSrcの活性状態が本当に増殖能に影響しているかを評価するため、Src阻害剤であるPP2、Dasatinib、Saracatinibを培養液に添加し、その増殖能への影響を比較した。いずれの阻害剤を添加してもSrcの活性が低下することをウェスタンブロッティングにて確認した。また、いずれの阻害剤にてもA549細胞の増殖能が抑制されてい

たため、この細胞においてSrcの活性が増殖能に影響していることが分かった。

5. Cbp導入の影響が増殖能以外の癌形質に影響を与えるかを検討した。運動能に関してはwound healing assayを、遊走能に関してはmigration assayを行い評価した。いずれの癌形質に関しても、Cbpを導入することで抑制されることが明らかとなつた。また、転移能にも影響を与えるか検討するため、マウスの尾静脈から癌細胞を注入し、肺転移巣での結節数を測定することで定量的に評価した。すると、Cbpを導入することでin vivoでの転移能にも抑制効果を示すことが明らかとなつた。

6. 次に、実際の手術検体からCbpのmRNAを抽出し、各症例での発現量を比較した。するとリンパ節転移の有無で症例を二分し比較したところ、転移陽性症例では陰性症例にくらべてCbpの発現が有意に低いことが明らかとなつた。この結果から、実際の症例においてもCbpが転移能に影響を与えている可能性が示唆された。

[総括]

Srcの活性が亢進している癌細胞においては、その抑制因子であるCbpを導入することで様々な癌形質（増殖・浸潤・転移）を抑制することが明らかとなつた。その抑制のメカニズムにはCbp-Cskを介したSrcの効率的な活性調節が重要な役割を果たしていると考えられた。また、Cbpは癌細胞において全般的に発現が抑制されており、その発現調節メカニズムを詳細に解析することで癌に対する新たな治療戦略を考える一助になりうると考えられた。

論文審査の結果の要旨

上記学生は、当教室と微生物学研究所発癌制御研究分野との共同研究テーマである、「非小細胞肺癌における膜アダプターパクCbpによるSrc依存の癌形質発現の抑制機構」に関する研究に従事しました。研究内容は、Srcチロシンキナーゼの活性を負に制御するCbp (Csk-binding protein)がヒト肺癌細胞においてどのように発現し、またどのような機能を有するかを解析しました。実験内容としては、細胞培養・ウェスタンブロッティング・PCR・遺伝子導入など分子生物学の実験手技を駆使して細胞レベルの研究をすすめました。また、肺癌手術検体からtRNAを抽出し、CbpのmRNA量を比較することで実際の癌組織においても細胞レベルで考えられた仮説の検証をおこないました。このように細胞レベルの基礎研究から臨床検体を用いた解析まで行うことで、肺癌診療にたずさわる呼吸器外科医の観点からも興味深い研究成果を主論文に発表することができました。上記業績から学位授与に相当するものと考えます。